

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07K 19/00

C12N 15/62 C12N 15/63

C12N 15/81 A61K 38/38

A61P 43/00



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03110364.2

[43] 公开日 2004年7月28日

[11] 公开号 CN 1515591A

[22] 申请日 1996.12.19 [21] 申请号 03110364.2  
分案原申请号 96199466.5

[30] 优先权

[32] 1995.12.30 [33] GB [31] 9526733.2

[71] 申请人 达尔塔生物技术有限公司

地址 英国诺丁汉郡

[72] 发明人 戴维·J·巴兰斯

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所  
代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书2页 说明书18页 附图13页

[54] 发明名称 生长激素和血清白蛋白重组融合蛋白

[57] 摘要

在酵母中良好分泌的白蛋白和生长激素的融合蛋白，或两者变种的融合蛋白，并增加了血清和贮存的稳定性。

ISSN 1008-4274

1. 一种重组融合蛋白，其包含与生长激素(GH)的一相同长度区至少具75%序列同源性的至少十个氨基酸的第一区和与血清白蛋白一相同长度区域至少具有75%序列同源性的至少十个氨基酸的第二区。  
5
2. 权利要求1的融合蛋白，其包含与生长激素(GH)的变种和与血清白蛋白的变种。
3. 权利要求1的融合蛋白，其在两个融合部分间还具有一个接头肽。
4. 一种由氨基酸组成的多肽，包括与生长激素(GH)的一相同长度区至少具75%序列同源性的至少十个氨基酸的第一区和与血清白蛋白一相同长度区域至少具有75%序列同源性的至少十个氨基酸的第二区。  
10
5. 权利要求4的多肽，其分子量低于100KD。
6. 一种由一个通过肽键连接在一起的氨基酸连续区域组成的多肽，包括与生长激素(GH)的一相同长度区至少具75%序列同源性的至少十个氨基酸的第一区和与血清白蛋白一相同长度区域至少具有75%序列同源性的至少十个氨基酸的第二区。  
15
7. 根据权利要求6的多肽，其中每个所述的第一区和第二区分别与所述长度的GH及白蛋白至少具有95%的序列同源性。
8. 根据权利要求7的一个多肽，其中每一个所述的第一区和第二区至少具50个氨基酸长。  
20
9. 根据任一前述权利要求的多肽，其中第一区由GH的C-末端的不间断氨基酸，或其保守性修饰产物组成，而此多肽结合并激活的GH受体。
10. 根据权利要求9的一个多肽，其中第一区为191个氨基酸长。
11. 根据任一前述权利要求的一个多肽，其中的白蛋白和/或生长激素是人源的。  
25
12. 根据任一前述权利要求的一个多肽，其中第二区具有至少一个白蛋白的不间断结构域，或其保守性修饰产物。
13. 根据权利要求12的一个多肽，其中第二区含有人白蛋白的1-105, 120-194, 195-291, 316-387, 388-491, 512-585, 1-194, 195-387, 388-585, 1-387, 或195-585的不间断氨基酸，或其保守性修饰产物。  
30
14. 根据任一前述权利要求的一个多肽，其中此多肽的N-末端含有所

说的第一区，而C-末端含有所说的第二区。

15. 根据权利要求6-13任一的多肽，其中该多肽的N-末端含有所说的第二区，而C-末端含有所说的第一区。

16. 根据任一前述权利要求的一个多肽，含有所说第一区和第二区，  
5 任选地在此多肽的任一端再加入氨基酸或其它化合物。

17. 一种微生物培养基，它含有转化的细胞和根据任一前述权利要求的多肽。

18. 一种微生物培养基，具有根据权利要求6至16中任一的多肽。

19. 一种编码根据权利要求6至16中任一的多肽的多聚核苷酸。

10 20. 一种微生物宿主，具有便于宿主中表达的根据权利要求19的多聚核苷酸。

21. 根据权利要求20的一个宿主，其中多肽由宿主分泌。

22. 用于获得根据权利要求6至16中任一的多肽的方法，包括培养一种根据权利要求20或21的宿主及纯化该多肽。

15 23. 一种药物制剂，含有根据权利要求6至16中任一的多肽及药物可接受的载体。

24. 一种治疗患有可用生长激素治疗的疾病的病人的方法，该方法包括给病人施用缓解所说的病情的，不足以产生毒性量的根据权利要求6至16中任一的多肽。

20 25. 一种提高动物体内瘦肉/肥肉的生长比率使之超过正常值的方法，包括对动物施用有效量的根据权利要求6至16中任一的多肽。

26. 一种生产生长激素的方法，包括在一种微生物宿主内，优选地在酵母中，表达根据权利要求19的一个多核苷酸，此编码的多肽因而在所述的第一区和第二区间有一个位点，此位点可被宿主中的一种酶所切割，或被  
25 任何其它的酶，或化学方法切割。

生长激素和血清白蛋白  
重组融合蛋白

5

本发明申请是申请号为 96199466.5, 申请日为 96.12.19, 发明名称为“生长激素和血清白蛋白重组融合蛋白”的发明申请的分案申请。

发明领域

10 本发明涉及重组融合蛋白、生长激素(GH)、血清白蛋白和酵母中的蛋白产物。

背景技术

15 人血清白蛋白(HSA)是一具有 585 个氨基酸的蛋白质,它是血清中渗透压的一个重要组成部分,而且起内源和外源配体的载体的作用。目前,临床上所用的 HSA 是从人的血浆中提取出来的。微生物体内重组 HA(rHA)的生产已在 EP 330 451 和 EP 361 991 中公开。

白蛋白作为一种载体分子的作用及其惰性质对它用作一稳定剂和多肽的运载蛋白是必需的特征。白蛋白作为融合蛋白的组份,以稳定其它蛋白质的应用已在 WO 93/15199, WO 93/15200 和 EP 413 622 中公开。HSA 的 N-端片段融合到多肽上去的用途亦已在 EP 399 666 中公开。融合到所说多肽上去是通过遗传操作的方法,使得编码 HSA 的 DNA 或其片段与编码所说多肽的 DNA 连接。然后,用该融合核苷酸转化或转染合适的宿主,从而使得合适的质粒表达融合多肽。Nomura 等在 1995 年曾尝试在酿酒酵母中表  
25 达人的载脂蛋白 E 成和 HSA 或 HSA 的片段的融合蛋白,并利用 HSA 的前序列直接分泌。发现当和 HSA 全长融合时导致介质中分泌的融合蛋白量低(最大产量为每升 6.3mg),而与 HSA 的 1 到 198 个氨基酸序列或 1 至 390 个氨基酸序列融合时,导致融合蛋白不分泌到介质中。

人生长激素(见 Strobl 和 Thomas 1994 年的综述)由 191 个氨基酸的单  
30 肽组成,其内部通过两个二硫键形成交联。每一个 hGH 分子可与两个 hGH 受体分子结合以便于信号传导(Cunningham 等 1991; de Vos 等 1992)。hGH

分子的 C-末端与结合第一个受体分子相关,但其 N-末端与受体的结合的相关程度是未知的。该激素由下丘脑控制下的前体垂叶腺分泌,它引起体内大范围的生长促进效应。临床上, hGH 用于治疗垂体性侏儒病,儿童期慢性肾功能不全,骨折和烧伤。现在用于治疗的 hGH 的生产方法是从人脑垂  
5 体腺中提取,或者在 EP 127 305(Genentech)中公开的大肠杆菌(E.Coli)中重组表达,或者为哺乳动物细胞培养中的重组表达(Zeisel 等, 1992)。

除此之外, hGH 已在酵母细胞内表达(Tokunaga 等, 1995),此生物体可提供一个 EP 60 057(Genentech)中揭示的方法的一种变通形式。Tsiomenko 等报道了酵母 MF $\alpha$ -1 前引导序列在酵母中分泌 hGH 中的作用。  
10 将此前导序列的前端部分(pre-portion)与 hGH 基因结合导致 hGH 在外周质和液泡中的积累,而前导序列的前部分(pro-portion)与 hGH 基因的接合则导致定位于细胞内的非糖基化前体的表达。只有在前导序列两部分均与 hGH 基因结合,才能使 hGH 分泌到培养基中。其它的分泌信号(前序列)同样无助于 hGH 分泌到培养基中,除非用酵母自身的原序列(pro sequence),  
15 说明这种原序列对酵母中 hGH 的分泌是关键。

在人体中, hGH 以脉冲的形式分泌到血液中,其在循环过程中的半衰期少于 20 分钟(Haffner 等, 1994)。该激素的清除主要通过肝和肾中的代谢,成人中的清除速度快于儿童(Kearns 等, 1991)。hGH 不足的治疗一般持续六到二十四个月,其间每星期肌肉注射三次或者每天进行皮下注射。这种  
20 频繁的治疗方法是必需的,因为该分子的半衰期短。

Poznansky 等 1988 年通过将 hGH 和猪源或人源的血清白蛋白(HSA)缀合成一相当大的缀合体(约 180KD)的方法延长了猪生长激素的半衰期。利用交联剂戊二醛进行的化学反应,使得平均每两个白蛋白分子和六个生长激素分子缀合。所产生的 180KD 的缀合体在小鼠中的半衰期达到 2 到 3 小时,  
25 而没有发生缀合的生长激素在小鼠中的半衰期只有五分钟。活性测定表明:缀合体在体外保持全部活性,甚至可能增加了活性,但在体内无活性。

### 发明内容

本发明涉及将一个白蛋白分子,或其变种或片段与一个生长激素分子,  
30 或其变种或片段融合,所形成的融合蛋白较未融合的生长激素延长了循环半衰期。为方便起见,只提到人白蛋白(HA)和人生长激素(hGH),但其它脊

椎动物的白蛋白和生长激素均包括在内。优选地，含有 HA，或其变种或片段的 N-末端部分和 hGH，或其变种，或片段的 C-末端部分的融合蛋白可使受体结合的所有可能的负效应最小化。或者，含有 HA，或其一个变种，或其片段的 C-末端部分和 hGH，或其一个变种，或其片段的 N-末端部分

5 的融合蛋白同样具信号传导的作用。一般地，此多肽只具有一个 HA 来源的区域和一个 GH 来源的区域。

另外，本发明中的融合蛋白在其两个融合部分间还具有一个接头肽，以便于融合蛋白两组分间有较大的物理隔离 (physical separation)，从而使 hGH 部分最大可能地与 hGH 受体结合。接头肽由氨基酸组成使得其是柔

10 韧性或刚性的。

接头序列可通过一种蛋白酶或化学方法切割，以产生生长激素相关的部分。优选地，此蛋白酶可由宿主天然产生，如：啤酒糖酵母蛋白酶 Kex2 或相当的蛋白酶。此后，本发明还进一步提供通过在一合适的宿主中表达

15 编码本发明中多肽的聚核苷酸以制备生长激素，或其变种，或其片段的方法及切割可切割的接头以产生 GH-型复合物和从宿主培养基中以更纯的形式获得 GH-型复合物的方法。

发现：本发明中的多肽在溶液中的稳定性明显高于 hGH。后者在溶液中 4°C 下贮存一个月后迅速失活。现在市售 hGH 为冻干粉剂。

合适地，融合多肽是由酵母，微生物，如细菌，人细胞系或酵母以重

20 组分子的形式分泌产生。优选地，此多肽可从宿主中分泌出来。发现：将编码 hGH 的序列融合到编码 HA 序列的 5'-端或 3'端，酵母均可以分泌此融合蛋白，而无需一种酵母来源的原序列 (pro sequence)。此发现是惊人的，因为其他工作者们发现酵母来源的原序列对酵母有效分泌 hGH 是必需的。如：Hiramitsu 等 1990 年和 1991 年分别发现微小毛霉 (*Mucor pusillus*)

25 菌株凝乳酶前原引导序列 (pre-pro leader) 中原序列 (pro sequence) 的 N-端部分是重要的。其他的作者，在用 MF $\alpha$ -1 信号分泌 hGH 时，总是包括 MF $\alpha$ -1 的原序列。此原序列被认为是作为一种分子内的分子伴侣而有助于 hGH 的折叠过程。本发明显示 HA 或 HA 的片段可行使相似的功能。

因而，本发明中的一个具体的实施方案包括：酵母中有效地直接分泌

30 编码信号序列的 DNA 构建体，尤其是酵母-来源信号序列 (特别是与酵母宿主有同源性的信号序列)，和本发明的第一方面的融合分子，其中信号和成

熟的多肽间没有酵母来源的原序列存在。

啤酒糖酵母 (*S. cerevisiae*) 转化酶的信号酵母来源信号的优选的实施例子。

5 不考虑 Poznansky 等 1988 年利用化学交联方法连接两个分别制备的那种缀合体。

白蛋白或 hGH 可以分别是正常 HSA/rHA (下文称为“HA”) 或 hGH 的一个变体。在这些“变体”中, 包括在保守区域或非保守区域的插入, 缺失和取代, 但这些变化不能明显改变白蛋白的一个或多个肿胀的 (oncotic) 有用的配体结合和非免疫原的特征, 或在 hGH 中则是其非免疫原性及可结合并  
10 激活 hGH 受体的能力。特别地, 将人白蛋白和人白蛋白片段中天然发生的多态性变体包括在内, 如: 在 EP 322 094 中公开的那些片段 (称为 HA (1 - n), 其中 n 指 369 到 419)。白蛋白或生长激素可来自于任何脊椎动物, 特别是任何哺乳动物, 如: 人、牛、羊、猪、鸡 (hen), 或鲑鱼。融合蛋白中的白蛋白和 GH 部分可分别来自于不同的动物。

15 “保守性替代物”用指在诸如: 甘氨酸 (Gly), 丙氨酸 (Ala); 缬氨酸 (Val), 异亮氨酸 (Ile), 亮氨酸 (Leu); 天冬氨酸 (Asp), 谷氨酸 (Glu); 天冬酰胺 (Asn), 谷氨酰胺 (Gln); 丝氨酸 (Ser), 苏氨酸 (Thr); 赖氨酸 (Lys), 精氨酸 (Arg); 和苯丙氨酸 (Phe), 酪氨酸 (Tyr) 这些组中的替换。只要本领域内认为允许插入和删除是惯常的, 这些变体与同一长度的正常 HA 或 hGH  
20 具有至少 75% 的序列同源性 (优选地是至少具 80%, 90%, 95%, 或 99% 的同源性), 而且比其它长度的正常 HA 或 hGH 更具同源性。概括地说, 一 HA 变体至少具 100 个氨基酸长度, 优选地至少有 150 个氨基酸长度。此 HA 变体至少包含或是由 HA 的一个完整的结构域组成, 如结构域 1 (1 - 194),  
2 (195 - 387), 3 (388 - 585), 1 + 2 (1 - 387), 2 + 3 (195 - 585), 或 1 + 3 (1  
25 - 194, + 388 - 585)。每个结构域本身由两个同源亚结构域组成, 这些亚结构域称为 1 - 105, 120 - 194, 195 - 291, 316 - 387, 388 - 491, 和 512 - 585, 包括赖氨酸 (Lys) 106 至谷氨酸 (Glu) 199, 谷氨酸 (Glu) 292 至缬氨酸 (Val) 315 和谷氨酸 (Glu) 492 至丙氨酸 (Ala) 511 区的氨基酸残基的带有柔性的间 - 亚结构域接头区域。优选地, 融合蛋白的 HA 部分至少包含一个 HA  
30 的亚结构域, 或结构域, 或它们的保守性修饰部分。如果此融合蛋白基于亚结构域, 部分或全部的毗邻的接头优选地用于连接 hGH 组成成分。hGH 的

变体应具有 GH 活性，一般至少具有十个氨基酸(尽管一些作者发现仅具四个残基时同样具活性)，优选地至少有 20 个氨基酸，优选地至少有 50, 100, 150, 180, 或 191 个氨基酸长，并优选地保留其两个内部二硫键的半胱氨酸(Cys)。

- 5 本发明中融合分子的分子量一般低于 100KD，如低于 90KD，或 70KD。因而它们较 Poznansky 等的 180KD 的缀合体(见前文)要小得多，而后者体内是无活性的。正常情况下，该融合蛋白的分子量至少有 20KD，通常至少有 30KD，或 50KD。大多数融合蛋白的分子量大小介于 60 至 90KD 间。

本发明的第二个主要部分是提供转化酵母以表达本发明中的融合蛋白。

除转化宿主细胞自身外，本发明还考虑在一营养介质中进行这些细胞的培养，优选地单克隆(克隆均一的)培养，或一来自于单克隆培养物的培养。特别是一旦多肽分泌，培养基中同时具有此多肽和这些细胞，或者通过过滤或离心的方法将这些细胞除去。

- 15 已知有许多表达系统，包括细菌(如：大肠杆菌(E. Coli)，和枯草芽孢杆菌(B. Subtitis))，酵母菌(如：啤酒糖酵母(S. cerevisiae)、乳克鲁维氏酵母(K. lactis)、和巴斯德毕赤氏酵母(Pichia pastoris))，丝状真菌(如：曲霉菌属(Aspergillus))，植物细胞，动物细胞及昆虫细胞。

所需蛋白通过便捷的方式产生，如从插入到宿主染色体或一自游离质粒的编码序列中产生。

转化所需蛋白的编码序列到酵母中去可用通常的方法，如：电穿孔。用电穿孔转化酵母的方法已被 Becker 和 Guarente 公开，(《酶学方法(Methods Enzymol)》1990 年，第 194 期第 182 页)。

成功转化的细胞，即含有本发明中 DNA 构建体的细胞，可通过人们熟知的技术加以鉴定。如，细胞中表达构建体的引入将生长产生所需的多肽。这些细胞经收集并裂解，可用 Southern 1975 年发表在《分子生物学杂志(J. Mol. Biol)》第 98 期第 503 页的方法，或 Berent 等 1985 年发表于《生物技术(Biotech)》第三期第 208 页的方法来检查其 DNA 中该 DNA 的存在与否。或者，上清中的蛋白可用抗体进行检测。

30 有用的酵母质粒载体包括 pRS 403 - 406 和 pRS 413 - 416，这些载体一般可从 Stratagene Cloning Systems 获得，(Stratagene Cloning systems,



La Jolla, CA 92037, USA)。质粒 pRS 403, pRS 404, pRS 405 和 pRS 406 为酵母整合型质粒 (YIp), 并结合有酵母选择性标记 HIS3, TRP1, LEU2 和 URA3。质粒 pRS 413 - 416 为酵母着丝粒质粒 (YCp)。

5 已构建了各种通过互补粘性末端将 DNA 可操作地连接到载体上去的方法。如, 在 DNA 片段上加上互补的同聚体序列, 从而插入到载体 DNA 中去。然而, 载体和 DNA 片段通过在互补的同聚体尾间形成氢键连结以组成重组 DNA 分子。

具有一个或多个限制性位点的合成接头提供了将 DNA 片段连到载体上去的另一种方法。通过限制性内切酶降解的 DNA 片段用噬菌体 T4 DNA 聚合酶或大肠杆菌 (E. Coli) DNA 聚合酶 I 处理, 这些酶以它们的 3' - 5' 核酸外切酶活性除去 3' - 单链的突出末端, 然后用其聚合酶活性补平 3' - 凹端。

10 这些活性的联合使用从而产生了具平末端的 DNA 节段。然后此平末端的节段与摩尔数过量的多的接头分子在可以催化平末端 DNA 分子连接的酶 (如噬菌体 T4 DNA 连接酶) 的存在下温育。因此, 反应产物为末端携有同聚体接头序列的 DNA 节段。然后, 将此 DNA 节段用一合适的限制性酶切割, 并连到用酶切并产生和这些 DNA 节段的相容的末端的表达载体上。

具有各种限制性内切酶识别位点的合成接头已商品化, 可通过包括国际生物技术公司 (International Biotechnologies Inc, New Haven, CN, USA) 在内的各种途径获得。

20 若需要, 如, 制备 HA 的变体, 修饰本发明 DNA 的一个理想方法可用 Saiki 等 1988 年发表在《科学 (Science)》第 239 期第 487 - 491 页的聚合酶链式反应 (PCR) 方法。在此方法中, 待酶促扩增的 DNA 在其两侧分别加上了两个特异的寡核苷酸引物, 而引物本身可掺入该扩增的 DNA 中。所说的特异引物可有限制性内切酶识别位点, 可用本领域周知的方法将之克隆到表达载体 25 体中去。

本发明中所用的能用于表达融合蛋白的宿主酵母菌示范属为: 毕赤氏酵母属 (Pichia (Hansenula)), 酿酒酵母属 (Saccharomyces), 克鲁维酵母菌属 (Kluyveromyces), 念珠菌属 (Candida), 圆酵母属 (Torulopsis), 有孢圆酵母属 (Torulaspora), 裂殖酵母属 (Schizosaccharomyces), 固囊酵母属 (Citeromyces), (Pachysolen), 德巴利酵母属 (Debaromyces), 梅奇酵母属 (Metschnikowia), 红冬孢属 (Rhodosporidium), 无色担孢子属

(*Leucosporidium*)，葡状子囊菌属 (*Botryosaccharomyces*)，锁掷酵母属 (*Sporidiobolus*)，拟内孢霉属 (*Endomyces*)，及类似属。优选的属选自：酿酒酵母属 (*Saccharomyces*)，裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces*)，克鲁维酵母菌属 (*Kluyveromyces*)，毕赤氏酵母属 (*Pichia*) 和有孢圆酵母属 (*Torulaspora*)。其中酿酒酵母属 (*Saccharomyces* spp) 属中有酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)，*S. italicus* 和 *S. rouxii*。克鲁维酵母菌属 (*Kluyveromyces* spp.) 属中有：脆壁克鲁维酵母 (*K. fragilis*)，乳克鲁维酵母 (*K. lactis*) 和马克斯克鲁维酵母 (*K. marxianus*)。合适的有孢圆酵母属 (*Torulaspora*) 种有戴尔数氏有孢圆酵母 (*T. delbrueckii*)。毕赤氏酵母属 (汉逊酵母属) (*Pichia* (*Hansenula*) spp.) 属中有 *P. angusta* (以前为多形汉逊氏酵母 (*H. polymorpha*))，异常毕赤氏酵母 (*P. anomala*) (以前为异常汉逊氏酵母 (*H. anomala*)) 和巴斯德毕赤氏酵母 (*P. pastoris*)。

转化酿酒酵母的方法已在 EP 251 744，EP 258 067 和 WO 90/01063 中概括地介绍了，所有这些均以参考文献形式并入本发明。

酿酒酵母中合适的启动子包括与 PGK1 基因，GAL1 或 GAL10 基因，CYC1，PHO5，TRP1，ADH1，ADH2 基因，甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)，己糖激酶 (hexokinase)，丙酮酸脱羧酶 (Pyruvate decarboxylase)，果糖磷酸激酶 (phosphofructokinase)，丙糖磷酸异构酶 (triose phosphate isomerase)，磷酸葡萄糖异构酶 (phosphoglucose isomerase)，葡糖激酶 (glucokinase)， $\alpha$ -配对因子外激素 ( $\alpha$ -mating factor pheromone)，a-配对因子外激素 (a-mating factor pheromone) 的基因有关的启动子，PRB1 启动子，GUT2 启动子，GPD1 启动子，杂合启动子 (包括 5'-调控区部分与其它启动子的 5'-调控区部分杂合，或与上游激活位点 (如：EP-A-258 067 中的启动子) 杂合的启动子)。

在粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 中用的便捷的调控启动子为 nmt 基因中的硫胺素阻遏型启动子 (该启动子已被 Maundrell 在 1990 年的《生物化学杂志 J. Biol. chem.》第 265 期第 10857-10864 中述及) 和葡糖阻遏型 fbp1 基因的启动子 (已被 Hoffman 和 Winston 在 1990 年的《遗传学 Genetics》第 124 期第 807-816 页中述及)。

转化 *Pichia* 以表达外源基因的方法已在如 Cregg 等 1993 年，及各种

phillips 专利(如 US 4 857 467, 以参考文献形式并入本发明)中描述, Pichia 表达试剂盒已商品化, 可从 Invitrogen BV, Leek, Netherlands 和 Invitrogen Corp., San Diego, California 获得。合适的启动子包括 AOX1 和 AOX2。

5 Gleeson 等 1986 年发表于《微生物遗传学杂志》(J. Gen. Microbiol) 第 132 期第 3459 - 3465 页的方法中包括 Hansenula 载体和转化的信息, 合适的启动子为 MOX1 和 FMD1; 而 EP 361991, Fleer 等(1991)及其他一些来自于 Phone - Poulenc Rorer 报道则告诉人们如何在克鲁维氏酵母属 (Kluyveromyces spp.) 中表达外源蛋白, 其中合适的启动子为 PGK1。

10 转录终止信号优选地为一真核基因的 3' - 侧序序列, 该序列中包括合适的转录终止信号和多聚腺苷酸信号。合适的 3' - 侧序序列为如那些天然连接在所用的表达控制序列上的基因, 即相当于启动子。或者, 在优选地用酿酒酵母 ADH1 基因终止信号时, 它们可以是不同的。

所需的融合蛋白可与一分泌型前导序列一起起始表达, 该前导序列可  
15 以是在所选择的酵母有效的前导序列。酿酒酵母中有用的前导序列包括来自于 EP - A - 387 319 中的配对因子  $\alpha$  多肽(MF  $\alpha$  - 1)和杂合引导序列。这些引导序列(或信号)在成熟的白蛋白释放到周围介质中去之前即被酵母切割。而且该前导序列包括: JP 62 - 096086(授权为 91/036516)中公开的酿酒酵母转化酶(SUC2); 酸性磷酸酶(PH05); MF  $\alpha$  - 1,  $\beta$  - 葡聚糖酶(BGL2)  
20 和致死毒素的前序列; S. diastaticus 的葡糖淀粉酶 II; S. carlsbergensis 的  $\alpha$  - 半乳糖苷酶(MEL1); K. lactis 中的致死毒素; 和念珠菌(Candida) 的葡糖淀粉酶。

本发明中的融合蛋白或其配方可通过任何传统的方法, 包括非经胃肠道(如皮下或肌肉)注射或静脉输注的方法给药。治疗包括在一段时间内使  
25 用单一剂量或复合剂量。

本发明中的融合蛋白可单独使用, 而优选地则为与一个或多个可接受的载体一起成药物制剂的形式使用。该载体必需在与融合蛋白相容且不能对受体自身有害的意义上说是“可接受的”。典型的载体为水或盐水, 它们  
30 需是无菌的, 且无致热原。此制剂需是非免疫原性的; 包括佐剂的疫苗型制剂不考虑。

该制剂可以单元剂量的便捷形式存在, 并可通过任何药物学领域已知

的方法制备。这些方法包括将融合蛋白与具有一种或多种辅助成份的载体接合到一块的步骤。概括地说，将活性成分和液相载体或细分固相载体或其两者紧密均匀结合以制备该制剂，然后，如果需要的话，将产品成形。

5 适合于非经胃肠道途径使用的制剂包括含水的或不含水的无菌注射液，该液含有抗氧化剂，缓冲液，抑菌剂和溶解物，使药物的渗透性与待施用受体血液中的渗透性相等；含水的和不含水的无菌悬浮液(包括悬浮剂和增稠剂)。该制剂可存在于单元剂量或多剂量的容器中，如密封的安瓿瓶和小管中，在冻干(冻干法)条件下贮存，使用前即加入无菌液态载体，如注射用水。临时性注射液和悬浮液可通过无菌粉剂制备。

10 优选的单元剂量制备是那些包括有活性成分的日用剂量或单元，日用亚剂量或其适当的小份。

本发明中的融合蛋白用于治疗任何表现出生长激素缺乏的情况，如孤立性生长激素缺乏症(isolated growth hormone deficiency)，全垂体功能减弱(Panhypopituitarism)，颅骨内照射后(following cranial irradiation) (如，在治疗白血病或脑肿瘤中)，先天性卵巢发育不全(Turner's - syndrome)，唐氏先天愚症(Down's Syndrome)，子宫生长障碍(intrauterine growth retardation)，自发性生长缺陷(idiopathic growth deficiency)，慢性肾衰竭(chronic renal failure)，软骨发育不全(achondroplasia)，雌性不孕(female infertility)和各种分解代谢紊

15 乱。它们也可用于刺激生长，和(或)增加家畜(如：牛、羊、山羊及猪)的瘦肉的比重。

该融合蛋白可与胰岛素样生长因子 I (IGF - 1) 一起给药。

使用剂量可通过融合蛋白的效价相对于 hGH 的效价计算出，此时考虑融合蛋白相对于天然 hGH 延长的半衰期。生长激素的典型用量为每星期 0.3

25 至 30.0IU/kg，如 0.9 至 12.0IU/kg/星期，如果一年三个或七个分包剂量施用或更多。在由全长 HA 和全长 GH 融合的融合蛋白中，按照单位的相当剂量意味着使用较大重量的制剂，但施用制剂的频率可降低，如一星期两次，一星期一次或更少。

本发明涉及一种由一个通过肽键连接在一起的氨基酸连续区域组成的

30 多肽，包括与生长激素(GH)的一相同长度区至少具 75% 序列同源性的至少十个氨基酸的第一区和与血清白蛋白一相同长度区域至少具有 75% 序列同

源性的至少十个氨基酸的第二区。

上述的多肽，其中每个所述的第一区和第二区分别与所述长度的 GH 及白蛋白至少具有 95% 的序列同源性。

上述多肽，其中每一个所述的第一区和第二区至少具 50 个氨基酸长。

- 5 前述各项的多肽，其中第一区由 GH 的 C-末端的不间断氨基酸，或其保守性修饰产物组成，而此多肽结合并激活的 GH 受体。

上述多肽，其中第一区为 191 个氨基酸长。

多肽，其中的白蛋白和/或生长激素是人源的。

- 10 前述任一项的一个多肽，其中第二区具有至少一个白蛋白的不间断结构域，或其保守性修饰产物。

上述的多肽，其中第二区含有人白蛋白的 1-105, 120-194, 195-291, 316-387, 388-491, 512-585, 1-194, 195-387, 388-585, 1-387, 或 195-585 的不间断氨基酸，或其保守性修饰产物。

- 15 前述任一项的多肽，其中此多肽的 N-末端含有所说的第一区，而 C-末端含有所说的第二区。

前述任一项的多肽，其中该多肽的 N-末端含有所说的第二区，而 C-末端含有所说的第一区。

前述任一项的多肽，含有所说第一区和第二区，任选地在此多肽的任一端再加入氨基酸或其它化合物。

- 20 本发明还涉及一种微生物培养基，它含有转化的细胞和根据前述任一项的多肽。

本发明还涉及一种微生物培养基，具有前述任一项的多肽。

本发明还涉及一种编码前述任一项的多肽的多聚核苷酸。

- 25 本发明还涉及一种微生物宿主，具有便于宿主中表达的根据上述的多聚核苷酸。

根据上述的一个宿主，其中多肽由宿主分泌。

用于获得前述任一项的多肽的方法，包括培养一种上述的宿主及纯化该多肽。

- 30 本发明还涉及一种药物制剂，含有根据前述任一项的多肽及药物可接受的载体。

本发明还涉及一种治疗患有可用生长激素治疗的疾病的病人的方法，

该方法包括给病人施用缓解所说的病情的，不足以产生毒性量的根据前述任一的多肽。

本发明还涉及一种提高动物体内瘦肉/肥肉的生长比率使之超过正常值的方法，包括对动物施用有效量的根据前述任一的多肽。

- 5 本发明还涉及一种生产生长激素的方法，包括在一种微生物宿主内，优选地在酵母中，表达根据前述的一个多核苷酸，此编码的多肽因而在所述的第一区和第二区间有一个位点，此位点可被宿主中的一种酶所切割，或被任何其它的酶，或化学方法切割。

## 10 附图说明

本发明优选的实施例将通过实施例和参考附图进行描述。其中：

- 图 1 示编码成熟的 hGH 的人生长激素 cDNA 序列；  
 图 2 示 pHGH1 的限制性酶切图；  
 图 3 示 pBST(+) 的限制性酶切图和多接头的 DNA 序列；  
 15 图 4 示 pHGH12 的构建；  
 图 5 示 pHGH16 的构建；  
 图 6 示 HSA cDNA 序列，特别是编码成熟蛋白的区域；  
 图 7 示 pHGH14 的构建；  
 图 8 示 pHGH38 的构建；  
 20 图 9 示 pHGH31 的构建；  
 图 10 示 pHGH58 或 pHGH59 的构建(实施例 7)；  
 图 11 为一具间隔区的融合蛋白的构建方案；

- 图 12 药物动力学研究结果以显示小鼠静脉注射  $^{125}\text{I}$  标记的 rHA-hGH 较之于 hGH 的清除率。所示数据为每组中的两只小鼠的数据，包括总放射  
 25 活性和可通过 TCA 沉淀的放射活性，即其与蛋白有关而不是与游离  $^{125}\text{I}$  有关。所计算出的 hGH 的清除半衰期约六分钟，而 rHA-hGH 融合蛋白的清除半衰期则达六十分钟，见实施例 3。

- - hGH(总数)
- - hGH(TCA 沉淀数)
- 30 ▼ - rHA-hGH(总数)
- ▲ - rHA-hGH(TCA 沉淀数)。

### 具体实施方式

所有标准的重组 DNA 过程见 Sambrook 等 1989 年的叙述, 不同情况时将注明。编码 HSA 的 DNA 序列来自于 EP 201 239 公开的 cDNA。

#### 5 实施例 1: hGH cDNA 的克隆。

hGH 的 cDNA 通过 PCR 扩增的方法从人垂体腺 cDNA 文库中获得(目录号为 HL1097V, (Clontech Laboratories, Inc)。两个适于 hGH cDNA 扩增的寡核苷酸引物: HGH1 和 HGH2 用应用生物系统 380B (Applied Biosystems 380B) 寡核苷酸合成仪合成。

10 HGH1: 5' - CCCAAGAATTCCCTTATCCAGGC - 3'

HGH2: 5' - GGAAGCTTAGAAGCCACAGGATCCCTCCACAG - 3'

HGH1 和 HGH2 与 hGH cDNA 序列相应部分分别有两个和三个核苷酸的区别(图 1, Martial 等, 1979), 从而, PCR 扩增后, 在 cDNA 的 5' - 端引入一个 EcoRI 位点, 3' - 端引入一个 BamHI 位点。此外, HGH2 中在紧接着 hGH  
15 序列下游存在一个 Hind III 位点。

用 Perkin-Elmer-Cetus Thermal Cycler 9600 扩增仪和 Perkin-Elmer cetus PCR 试剂盒进行 PCR 扩增是用分离于 cDNA 文库的噬菌体粒子 (phage particles) 的单链 DNA 模板进行的, 模板来源如下: 加入 10  $\mu$ l 噬菌体裂解缓冲液(含 280  $\mu$ g/ml. 蛋白酶 K 的 TE 缓冲液)以裂解 10  $\mu$ l 噬菌体  
20 粒子, 55 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟后, 85 $^{\circ}$ C 15 分钟。冰上培育 1 分钟后, 14,000rpm 离心 3 分钟以沉淀噬菌体碎片。PCR 反应混合液含 6  $\mu$ l 此 DNA 模板, 0.1  $\mu$ M 每种引物的浓度和均为 200  $\mu$ M 的每种脱氧核糖核苷酸。共进行 30 个 PCR 循环, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒, 65 $^{\circ}$ C 退火 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 秒, 每经一个循环将延伸时间增加 1 秒。通过凝胶电泳分析反应物显示一预期大小(589 个  
25 碱基)的单一产物。

PCR 扩增产物用 Wizard PCR Preps DNA 纯化系统 (Promega Corp) 进行纯化, 然后用 EcoRI 和 Hind III 酶切。进一步通过凝胶电泳纯化 EcoRI - Hind III 酶切片段后, 将它们克隆到一用 EcoRI 和 Hind III 酶解的 PUC 19 (GIBCO BRL) 质粒上, 形成 pHGH1 (图 2)。EcoRI - Hind III 区的 DNA 测序  
30 结果表明此 PCR 产物在序列上是和 hGH 序列相同 (Martial 等, 1979), 只是在其 5' - 端和 3' - 端分别加入了一个 EcoRI 位点和 BamHI 位点。

### 实施例 2: hGH cDNA 的表达

噬菌粒 pBluescribe(+) (Stratagene)的多接头序列通过在 EcoRI 和 Hind III 位点间插入由两个长 75-mer 的寡核苷酸退火形成的寡核苷酸接头被取代并形成 pBST(+) (图 3)。新的多接头中含有一个唯一的 NotI 位点  
5 (多接头区的全序列见图 3)。

含有 PRB1 启动子, 编码 HSA/MF $\alpha$ -1 杂合前导序列的 DNA, 编码 HSA 的 DNA, 和 ADH1 终止子的 pAYE 309 (EP 431 880) 的 NotI HSA 表达盒转化到 pBST(+) 上以形成 pHA1 (图 4)。用 Hind III 酶切将 HSA 的编码序列从该质粒上移去, 再重连以形成 pHA2 (图 4)。

10 实施例 1 中述及的 hGH cDNA 的克隆提供了缺乏原 hGH 序列和成熟 hGH 序列的前 8 个碱基对 (bp) 的 hGH 编码区。为构建酵母中分泌 hGH 的表达质粒, 在克隆的 hGH 序列的 5'-端如下加上一酵母启动子, 信号肽和该 hGH 序列的前 8 个碱基对:

将 pHA1 的 Hind III - SfaNI 的片段通过两合成的寡核苷酸 HGH3 和 HGH4  
15 加到 pHBH1 的 EcoRI - Hind III 片段的 5'-端:

HGH3: 5' - GATAAAGATTCCCAAC - 3'

HGH4: 5' - AATTGTTGGGAATCTTT - 3'

将如此形成的 Hind III 片段克隆到 Hind III 酶切的 pHA2 上构成 pHGH2 (图 4), 从而将 hGH cDNA 置于 PRB1 启动子和 HSA/MF $\alpha$ -1 融合前导序列 (WO 90/01063) 的下游区。包含在 pHGH2 中的 NotI 表达盒克隆到 NotI 酶切的 pSAC35 (Sleep 等, 1990) 中形成 pHGH12 (图 4), 其中 NotI 表达盒包括  
20 hGH cDNA 下游的 ADH1 终止子。此质粒含有整个 2  $\mu$ m 质粒, 从而具有复制功能和可用于筛选转化体的 LEU2 基因。

将 pHGH12 通过转化引入到酿酒酵母 DH1 (Sleep 等, 1990) 中, 单个的  
25 转化体在 10ml YEPD (1% w/v 酵母提取物, 2% w/v 蛋白胨, 2% w/v 葡聚糖) 中, 30 $^{\circ}$ C 生长三天。离心该细胞后, 上清通过 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE) 检测, 发现含有期望大小的蛋白质, 蛋白质印迹 (Western blots) 显示该蛋白可被抗 hGH 抗血清 (Sigma, Poole, UK) 识别。

### 实施例 3: HSA - hGH 融合蛋白的克隆和表达

30 为了将 HSA cDNA 融合到 hGH cDNA 的 5'-端, 由两个寡核苷酸 HGH7 和 HGH8 将 pHA1 Hind III - Bsu 36I 片段 (含有 HSA cDNA 的大部分) 和 pHGH1



的 EcoR1 - Hind III 片段连接:

HGH7: 5' - TTAGGCTTATCCCAAC - 3'

HGH8: 5' - AATTGTTGGGAATAAGCC - 3'

将如此形成的 Hind III 片段克隆到用 Hind III 酶切的 pHA2 中形成  
5 pHGH10(图 5), 此质粒 NotI 的表达盒克隆到 NotI 酶切的 pSAC35 中形成  
pHGH16(图 5)。

pHGH 16 用于转化到酿酒酵母 DB1 中, 培养的上清用实施例 2 中的方法  
分析。观察到一分子量大小约 88KD 的主带, 相当于 HA 和 hGH 结合后的大  
小。用抗 HSA 和抗 hGH 抗血清(Sigma)进行的 Western 印迹证实了融合蛋白  
10 中两个组成部分的存在。

从培养上清液中先后用阳离子交换层析, 阴离子交换层析和凝胶渗透  
层析法纯化该融合蛋白。通过其 N-端的氨基酸序列分析证明了预期的白蛋  
白序列的存在。

体外生长激素活性测定(Ealey 等, 1995)显示该融合蛋白具有全部的  
15 hGH 活性, 但与 hGH 标准相比其效价降低了。在一垂体摘除的小鼠体重增加  
模型(基本按照 European Pharmacopoeia(1987, monograph 556)描述的方法)中,  
当每天使用相同活性单位数量(以上述体外测定为基础)时, 融合蛋白分子  
较 hGH 具更高的效价。进一步实验, 即每四天用融合蛋白给药一次, 表明  
它与每天都使用 hGH 类似地具全部生长反应。药物动力学实验(即对小鼠给  
20 药 <sup>125</sup>I 标记的蛋白)表明融合蛋白的循环半衰期较 hGH 约增加了十倍(图 12)。

用编码酿酒酵母转化酶(SUC2)前导序列的 DNA 替代杂合前导序列以构  
建一相似的质粒, 从而编码的引导序列和与 HSA 序列接头如下:

MLLQAFLLLAGFAAKISA ↓ DAHKS.....

转化酶前导序列

HSA

25 在转化到酿酒酵母 DB1 中后, 该质粒控制表达和分泌融合蛋白的程度与用  
pHGH16 的相似。融合蛋白的 N-端分析显示了前导序列从成熟蛋白中精确  
和有效的切割。

#### 实施例 4 hGH - HSA 融合蛋白的克隆和表达

为了将 hGH cDNA 融合到 HSA cDNA 的 5' - 端(图 6), 首先通过定点突  
30 变改变 HSA cDNA 以在编码区的 5' - 端附近引入一个 EcoNI 位点。已通过  
Kunkel 等(1987 年)方法用由 pHA1 制备的单链 DNA 模板和一合成的寡核苷

酸 LEU4:

LEU4: 5' - GAGATGCACACCTGAGTGAGG - 3'

完成。用此寡核苷酸的定点突变是指改变 HSA cDNA 的编码区以使 Lys4 变为 Leu 4 (K4L)。然而, 这种改变在 hGH cDNA 的 5' - 端随后连到突变 pHA1 后即修复了。此连接是由两个寡核苷酸 HGH5 和 HGH6 将 pHGH2 的 NotI - BamHI 片段连在突变 pHA1 的 EcoNI - NotI 片段上。

HGH5: 5' - GATCCTGTGGCTTCGATGCACACAAGA - 3'

HGH6: 5' - CTCTTGTGTGCATCGAAGCCACAG - 3'

形成的 NotI 片段克隆到 NotI 酶切的 pSAC 35 上以构成 pHGH14 (图 7)。用 10 实施例 2 中的方法将 pHGH14 转化到酿酒酵母 DB1 中, 并分析培养上清。观察到一分子量大小约为 88KD 的主带, 其与 hGH 和 HA 结合后的大小相当。利用抗 - HSA 和抗 - hGH 抗血清进行的 Western 印迹实验证实了此融合蛋白的两个组成部分的存在。

培养上清液中的融合蛋白先后用阳离子交换层析、阴离子交换层析和 15 凝胶渗透层析法纯化。通过其 N - 端的氨基酸序列分析证明了预期的 hGH 序列的存在。

体外研究表明此融合蛋白保留有 hGH 的活性, 但其效价明显低于实施 例 3 中的含有全长 HA (1 - 585) N - 端部分和 hGH C - 端部分的融合蛋白。实施 例 5: 与 HSA 结构域融合的 hGH 的表达质粒的构建。

20 hGH 分子与 HA 的前两个结构域 (1 至 387 个氨基酸残基) 融合形成融合多肽。由寡核苷酸 HGH11 和 HGH12 将 pHA1 的 Hind III - SapI 片段 (该片段具有 HA 结构域 1 和 2 的大部分编码序列、) 连到 pHGH1 的 EcoRI - Hind III 片段上形成 hGH 的 N - 端融合。

HGH11: 5' - TGTGGAAGAGCCTCAGAATTTATCCCAAC - 3'

25 HGH12: 5' - AATTGTTGGGAATAAATTCTGAGGCTCTTCC - 3'

如此形成的 Hind III 片段克隆到 Hind III 酶切的 pHA2 上形成 pHGH 37 (图 8), 并将该质粒的 NotI 表达盒克隆到 NotI - 酶切的 pSAC 35 中。形成的质粒 pHGH38 (图 8) 具有一表达盒, 当转化到酿酒酵母 DB1 中后可将融合多肽直接分泌到上清液中。利用抗 - HSA 和抗 hGH 抗血清进行的 Western 30 印迹证实融合蛋白中两组成部分的存在。

从培养上清液中先后通过阳离子交换层析和凝胶渗透层析方法纯化该

融合蛋白。纯化蛋白体外研究显示其循环半衰期长于 hGH，与实施例 3 中具有全长 HA(1-585)N-端部分和 hGH C-端部分的融合蛋白循环半衰期相似。体外研究显示该融合蛋白保留有 hGH 的活性。

5 利用相似于上面详述的方法，将具有 HA 第一个结构域(第 1 至 194 个氨基酸残基)的 N-端部分和 hGH C-端部分的融合蛋白克隆到酿酒酵母 DB1 中并在其中表达。用抗 HSA 和抗 hGH 抗血清对上清液进行 Western 印迹分析，证明了融合蛋白中两组成部分的存在。

实施例 6: 通过在 HSA 和 hGH 间加入切割位点表达 hGH。

10 在 HA-hGH 融合蛋白间引入一可被 Kex2 蛋白酶识别的多肽序列可分泌 hGH。利用两寡核苷酸 HGH14 和 HGH15 将一编码丝氨酸(Ser)-亮氨酸(Leu)-天冬氨酸(Asp)-赖氨酸(Lys)-精氨酸(Arg)的序列引入。

HGH14: 5' - TTAGGCTTAAGCTTGGATAAAAGATTCCCAAC - 3'

HGH15: 5' - AATTGTTGGGAATCTTTTATCCAAGCTTAAGCC - 3'

15 这些用于将 pHA1 的 Hind III - Bsu 36I 片段接到 pHGH1 的 EcoRI - Hind III 片段上，然后克隆到 Hind III 酶切的 pHA2 中形成 pHGH25(图 9)。将此质粒的 NotI 表达盒克隆到 NotI 酶切的 pSAC35 中形成 pHGH31(图 9)。将 pHGH31 转化到酿酒酵母 DB1 中，SDS-PAGE 分析培养上清液，发现其分泌两种主要成分。此两种成分的分子量分别约为与(全长)HA 相当的 66KD，相当于(全长)hGH 的 22KD，显示体外可用 Kex2 蛋白酶或一相似活性蛋白酶切割此融合蛋白。用抗 HSA 和抗 hGH 抗血清进行的 Western 印迹证明了此两种分离成分的存在。对 hGH 部分的 N-端序列分析证明从 HA 部分的精确和有效的切割。

培养上清液先后通过阴离子交换层析和凝胶渗透层析以纯化 hGH 部分。此纯化的 hGH 的体外研究表明该蛋白具有活性并具全部的效价。

25 利用相似的策略，将含有 HA 第一个结构域(第 1 至 194 个氨基酸残基)，或者含有 HA 前两个结构域(第 1 至 387 个氨基酸残基)，并接有可被 Kex2P 蛋白酶识别的序列及 hGH cDNA 的融合蛋白克隆到酿酒酵母 DB1 中并表达。对培养上清液用抗 HSA 和抗 hGH 抗血清进行的 Western 印迹证明了此两种独立成分的存在。

30 实施例 7: HSA 和 hGH 通过一柔性接头序列的融合

通过寡核苷酸 HGH 16, HGH 17, HGH 18, HGH 19 的克隆，在 HSA 和 hGH

的融合蛋白间引入柔性接头, 该接头含有[甘氨酸(Gly) - 甘氨酸(Gly) - 甘氨酸(Gly) - 甘氨酸(Gly) - 丝氨酸(Ser)] $n$ 重复单元(其中 $n$ 可以是2或3)。

HGH16: 5' - TTAGGCTTAGGTGGCGGTGGATCCGGCGGTGGTGGAT

CTTTCCAAC - 3'

5 HGH17: 5' - AATTGTTGGGAAAGATCCACCACCGCCGGATCCACCG

CCACCTAAGCC - 3'

HGH18: 5' - TTAGGCTTAGGCGGTGGTGGATCTGGTGGCGGCGGAT

CTGGTGGCGGTGGATCCTTCCAAC - 3'

HGH19: 5' - AATTGTTGGGAAGGATCCACCGCCACCAGATCCGCC

10 GCCACCAGATCCACCACCGCCTAAGCC - 3'

HGH 16 和 HGH 17 间的退火导致  $n=2$ , 而 HGH 18 和 HGH 19 间的退火则导致  $n=3$ 。退火后, 双链寡核苷酸和来自于 pHGH 1 的 EcoRI - Bsu36I 片段克隆到 Bsu36I 酶切的 pHGH10 中形成 pHGH56 (此时  $n=2$ ) 和 pHGH57 (此时  $n=3$ ) (图 10)。相应地, 将这些质粒的 NotI 表达盒克隆到 NotI 酶切的 pSAC35  
15 中分别形成 pHGH58 和 pHGH59。

如图 11 中所示, 形成 pHGH56 和 pHGH57 的寡核苷酸克隆的接头序列中引入了一 BamHI 位点。因而可通过将来自于 pHGH56 的 Hind III - BamHI 片段连到来自于 pHGH57 的 BamHI - Hind III 片段上(使  $n=1$ ), 或将来自于 pHGH57 的 Hind III - BamHI 片段连到来自于 pHGH56 的 BamHI - Hind III 片段上(使  $n=2$ )以构建接头序列, 此接头序列中  $n=1$  和  $n=4$ 。这些片段如  
20 实施例 2 中描述的那样克隆到 pHA2 的 Hind III 位点中, 分别形成 pHGH60 ( $n=1$ ) 和 pHGH61 ( $n=4$ ) [见图 11]。来自于 pHGH60 和 pHGH61 的 NotI 表达盒克隆到 NotI 酶切的 pSAC35 中分别形成 pHGH62 和 pHGH63。

用 pHGH58, pHGH59, pHGH62 和 pHGH63 转化酿酒酵母形成可将融合多  
25 肽分泌到上清液中的转化子。

利用抗 HSA 和抗 hGH 抗血清进行的 Western 印迹试验证明融合蛋白中两组成部分的存在。

培养上清先后通过阳离子交换层析, 阴离子交换层析和凝胶渗透层析以纯化融合蛋白。氨基酸序列分析此蛋白 N-端证明了预期的白蛋白序列的  
30 存在。通过电喷射质谱学(electrospray mass spectrometry)分析此纯化的蛋白证明与实施例 3 中描述的 HSA - hGH 融合蛋白相比, 此蛋白质量如预期那样增加了 315D ( $n=1$ ), 630D ( $n=2$ ), 945D ( $n=3$ ) 和 1260D ( $n=4$ )。体

外实验中此纯化蛋白具有活性。

### 参考文献

- Cunningham, B. C. 等(1991)科学(Science)254, 821 - 825。  
de Vos, A. M. 等(1992)科学(Science)255, 306 - 312。
- 5 Ealey 等(1995)生长调节(Growth Regulation)5, 36 - 44。  
Gleeson 等(1986)微生物遗传学杂志(J. Gen. Microbiol)132, 3459 - 3465。  
Haffner, D. 等(1994)临床调研杂志(J. Clin. Invest. 93. 1163 - 1171)。  
Hiramitsu 等(1990)应用环境物生物(App. Env. Microbiol.)56, 2125 - 2132。
- 10 Hiramitsu 等(1991)国际书目: 情报与文献(ibid)57, 2052 - 2056。  
Hoffman 和 Winston 等(1990)遗传(Genetics)124, 807 - 816。  
Kearns, G. L. 等(1991)临床内分泌代谢杂志(J. Clin. Endocrinol. Metab.)72, 1148 - 1156。  
Kunkel, T. A. 等(1987)酶学方法(Methods in Enzymol.) 154, 367 - 382。
- 15 Martial, J. A. 等(1979)科学(Science)205, 602 - 607。  
Maundrell(1990)生物化学杂志(J. Biol. Chem.)265, 10857 - 10864。  
Nomura, N. 等(1995)生物科学, 生物技术, 及生物化学(Biosci. Biotech. Biochem.)59, 532 - 534。  
Poznansky, M. J. 等(1988)欧洲生物化学学会联合会通讯(FEBS lett.)239, 18 - 22。
- 20 Saiki 等(1988)科学(Science)239, 487 - 491。  
Sambrook, J. 等(1989)分子克隆(Molecular Cloning): 实验指南(a Laboratory Manual), 第二版(2nd edition), 冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold), 冷泉港(Spring Harbor, NY.)。
- 25 Sleep, . 等(1990)生物及生物技术(Bio/Technology)8, 42 - 46。  
Strobl, J. S. 和 Thomas, M. J. 等(1994)药理学综述(Pharmacol. Rev.)46, 1 - 34。  
Tokunage, T. 等(1985)基因(Gene)39, 117 - 120。  
Tsiomenko, A. B. 等(1994)生物化学(莫斯科)(Biochemistry) (Moscow)59, 1247 - 1256。
- 30 Zeisel, H. J. 等(1992)内分泌综述(Horm. Res.)37 增刊2(Suppl. 2), 5 - 13。

```

F P T I P L S R L F D N A M L R A H R
TTC CCA ACC ATT CCC TTA TCC AGG CTT TTT GAC AAC GCT ATG CTC CGC GCC CAT CGT
                                     ^50
L H Q L A F D T Y Q E F E E A Y I P K
CTG CAC CAG CTG GCC TTT GAC ACC TAC CAG GAG TTT GAA GAA GCC TAT ATC CCA AAG
                                     ^100
E Q K Y S F L Q N P Q T S L C F S E S
GAA CAG AAG TAT TCA TTC CTG CAG AAC CCC CAG ACC TCC CTC TGT TTC TCA GAG TCT
                                     ^150
I P T P S N R E E T Q Q K S N L E L L
ATT CCG ACA CCC TCC AAC AGG GAG GAA ACA CAA CAG AAA TCC AAC CTA GAG CTG CTC
                                     ^200
R I S L L L I Q S W L E P V Q S L R S
CGC ATC TCC CTG CTG CTC ATC CAG TCG TGG CTG GAG CCC GTG CAG TCC CTC AGG AGT
                                     ^250
V F A N S L V Y G A S D S N V Y D L L
GTC TTC GCC AAC AGC CTG GTG TAC GGC GCC TCT GAC AGC AAC GTC TAT GAC CTC CTA
                                     ^300
K D L E E G I Q T L M G R L E D G S P
AAG GAC CTA GAG GAA GGC ATC CAA ACG CTG ATG GGG AGG CTG GAA GAT GGC AGC CCC
                                     ^350
R T G Q I F K Q T Y S K F D T N S H N
CGG ACT GGG CAG ATC TTC AAG CAG ACC TAC AGC AAG TTC GAC ACA AAC TCA CAC AAC
                                     ^400
D D A L L K N Y G L L Y C F R K D M D
GAT GAC GCA CTA CTC AAG AAC TAC GGG CTG CTC TAC TGC TTC AGG AAG GAC ATG GAC
                                     ^500
K V E T F L R I V Q C R S V E G S C G
AAG GTC GAG ACA TTC CTG CGC ATC GTG CAG TGC CGC TCT GTG GAG GGC AGC TGT GGC
                                     ^550
F
TTC TAG

```

图 1 编码的成熟hGH的人生长激素cDNA序列

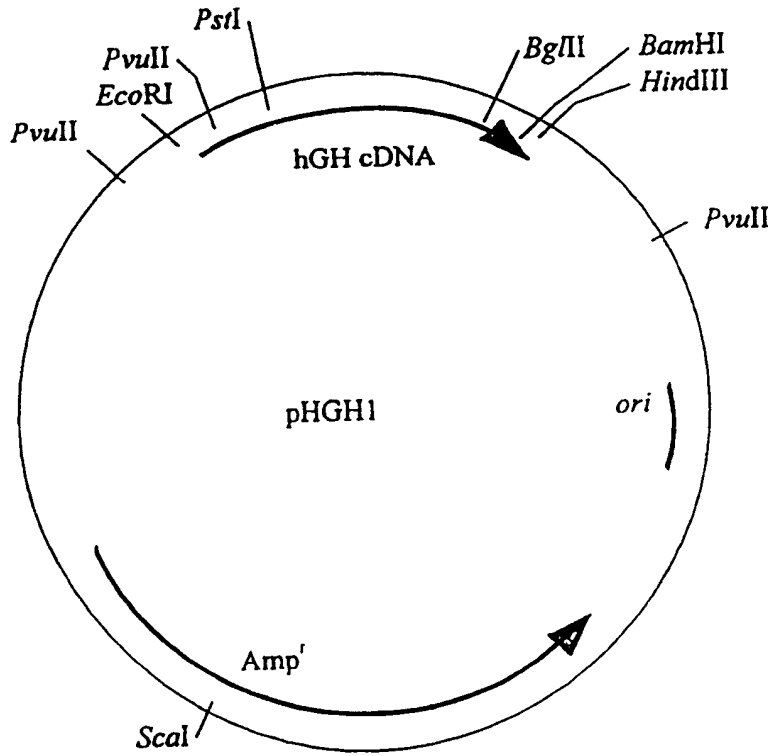


图 2

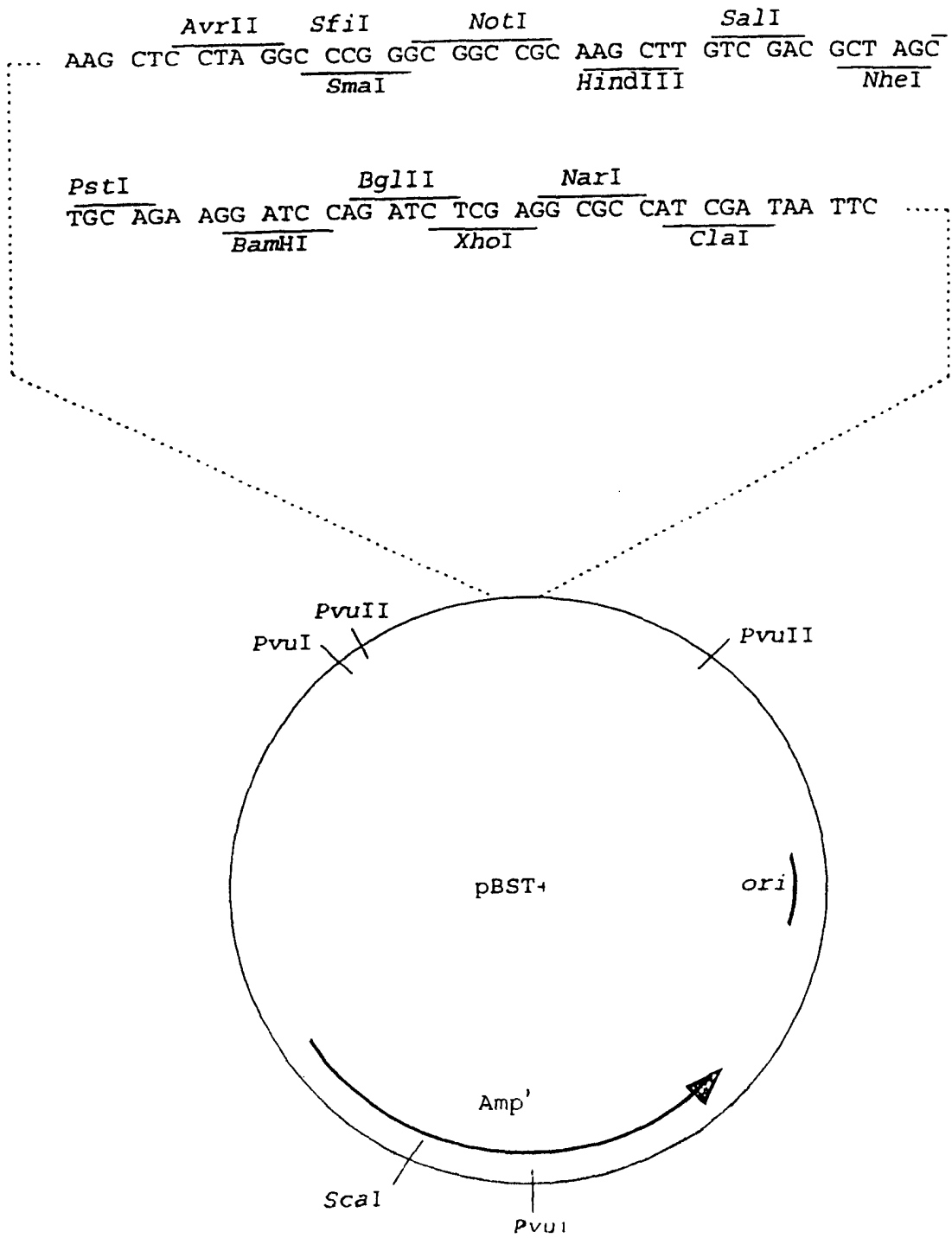


图 3



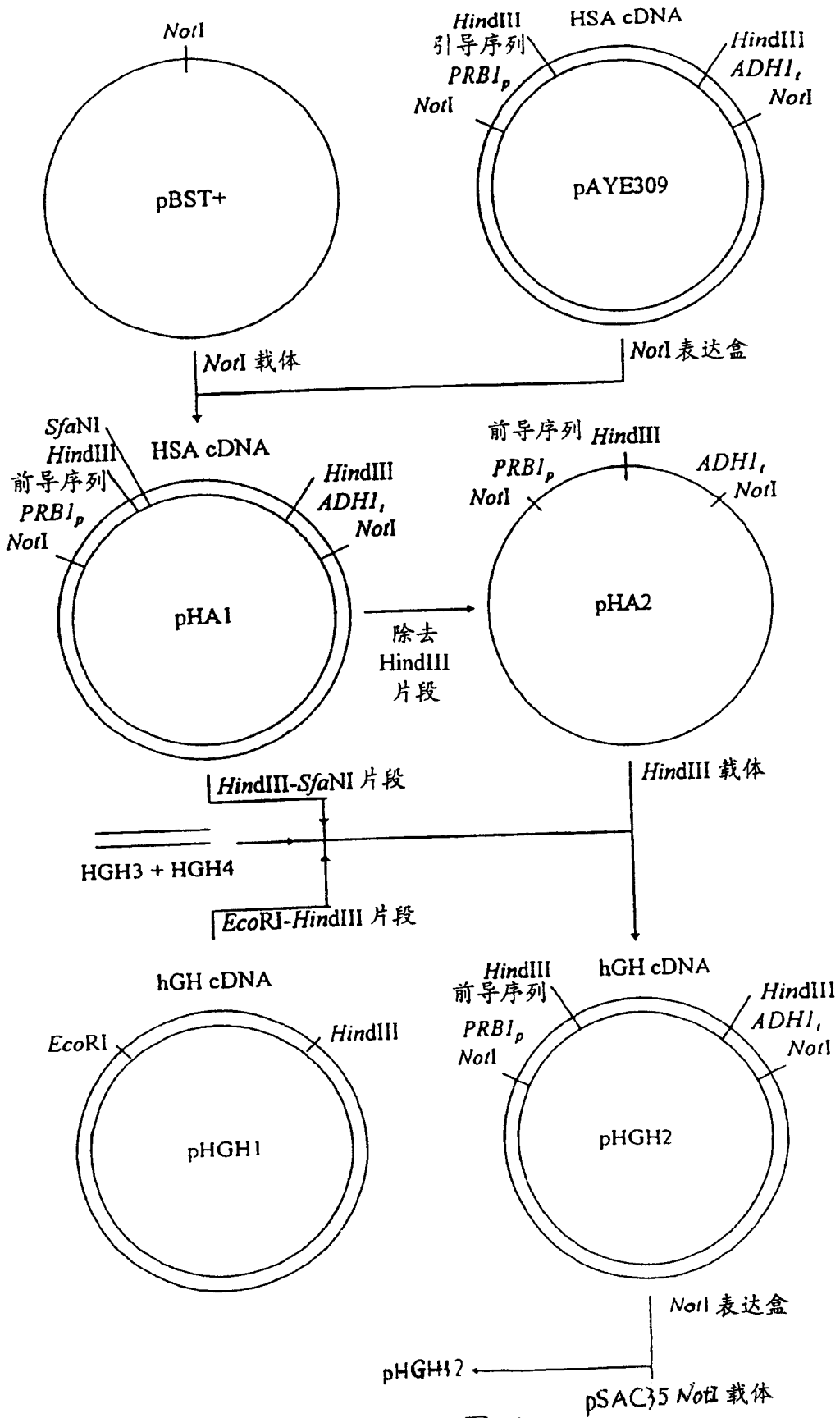


图 4

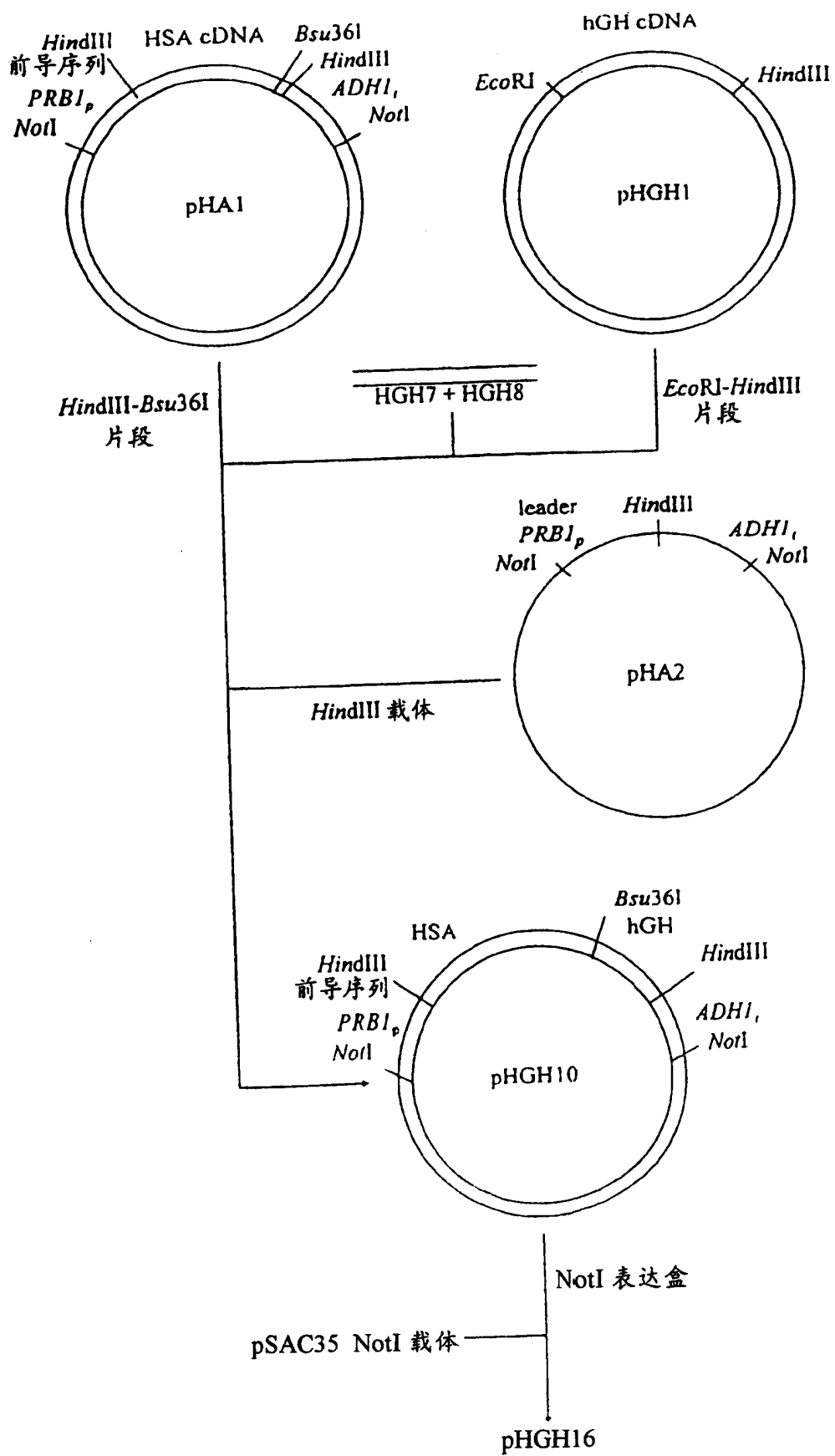


图 5

```

D A H K S E V A H R F K D L G E E N F
GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA GAA GAA AAT TTC
K A L V L I A F A Q Y L Q Q C P F E D
AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT
^100
H V K L V N E V T E F A K T C V A D E
CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT GAA TTT GCA AAA ACA TGT GTT GCT GAT GAG
S A E N C D K S L H T L F G D K L C T
TCA GCT GAA AAT TGT GAC AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA
^200
V A T L R E T Y G E M A D C C A K Q E
GTT GCA ACT CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA
P E R N E C F L Q H K D D N P N L P R
CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC CTC CCC CGA
^300
L V R P E V D V M C T A F H D N E E T
TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT CAT GAC AAT GAA GAG ACA
F L K K Y L Y E I A R R H P Y F Y A P
TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC CCG
^400
E L L F F A K R Y K A A F T E C C Q A
GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT
^500
A D K A A C L L P K L D E L R D E G K
GCT GAT AAA GCT GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG AAG
A S S A K Q R L K C A S L Q K F G E R
GCT TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAG TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA
^600
A F K A W A V A R L S Q R F P K A E F
GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTA GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT CCC AAA GCT GAG TTT
A E V S K L V T D L T K V H T E C C H
GCA GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT
^700
G D L L E C A D D R A D L A K Y I C E
GGA GAT CTG CTT GAA TGT GCT GAT GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA
N Q D S I S S K L K E C C E K P L L E
AAT CAA GAT TCG ATC TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA
^800
K S H C I A E V E N D E M F A D L P S
AAA TCC CAC TGC ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT TCA
^900

```

图 6 HSA cDNA 序列, 示编码成熟蛋白区

```

L A A D F V E S K D V C K N Y A E A K
TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT GCT GAG GCA AAG
D V F L G M F L Y E Y A R R H P D Y S
GAT GTC TTC CTG GGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT
^1000
V V L L L R L A K T Y E T T L E K C C
GTC GTG CTG CTG CTG AGA CTT GCC AAG ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT
A A A D P H E C Y A K V F D E F K P L
GCC GCT GCA GAT CCT CAT GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT
^1100
V E E P Q N L I K Q N C E L F E Q L G
GTG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAT TGT GAG CTT TTT GAG CAG CTT GGA
E Y K F Q N A L L V R Y T K K V P Q V
GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTA CCC CAA GTG
^1200
S T P T L V E V S R N L G K V G S K C
TCA ACT CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA AAA GTG GGC AGC AAA TGT
^1300
C K H P E A K R M P C A E D Y L S V V
TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC
L N Q L C V L H E K T P V S D R V T K
CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACG CCA GTA AGT GAC AGA GTC ACC AAA
^1400
C C T E S L V N R R P C F S A L E V D
TGC TGC ACA GAA TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT
E T Y V P K E F N A E T F T F H A D I
GAA ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA GAT ATA
^1500
C T L S E K E R Q I K K Q T A L V E L
TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT GCA CTT GTT GAG CTC
V K H K P K A T K E Q L K A V M D D F
GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT TTC
^1600
A A F V E K C C K A D D K E T C F A E
GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG
^1700
E G K K L V A A S Q A A L G L
GAG GGT AAA AAA CTT GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC TTA TAA

```

图 6 (接上页)

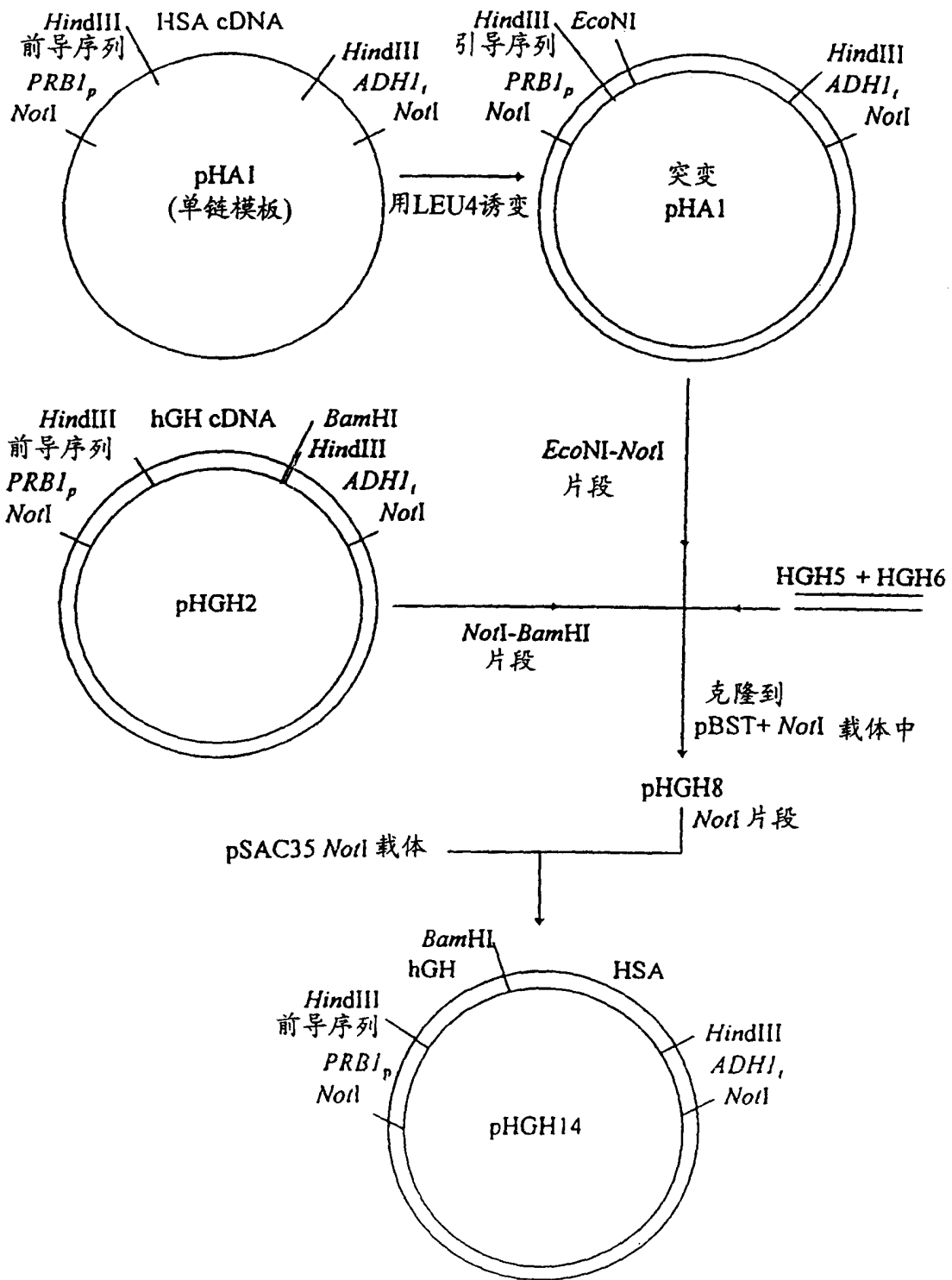


图 7

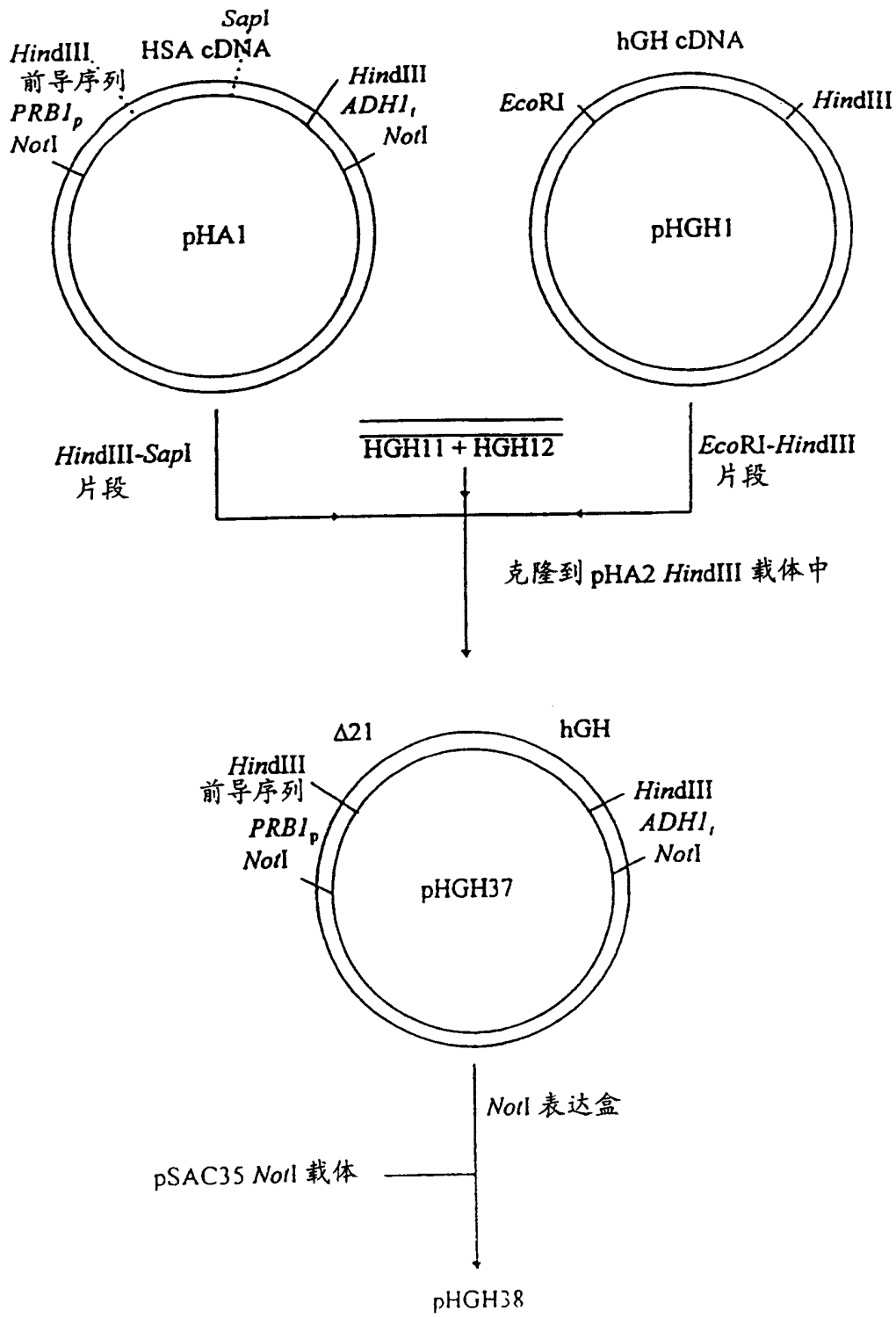


图 8

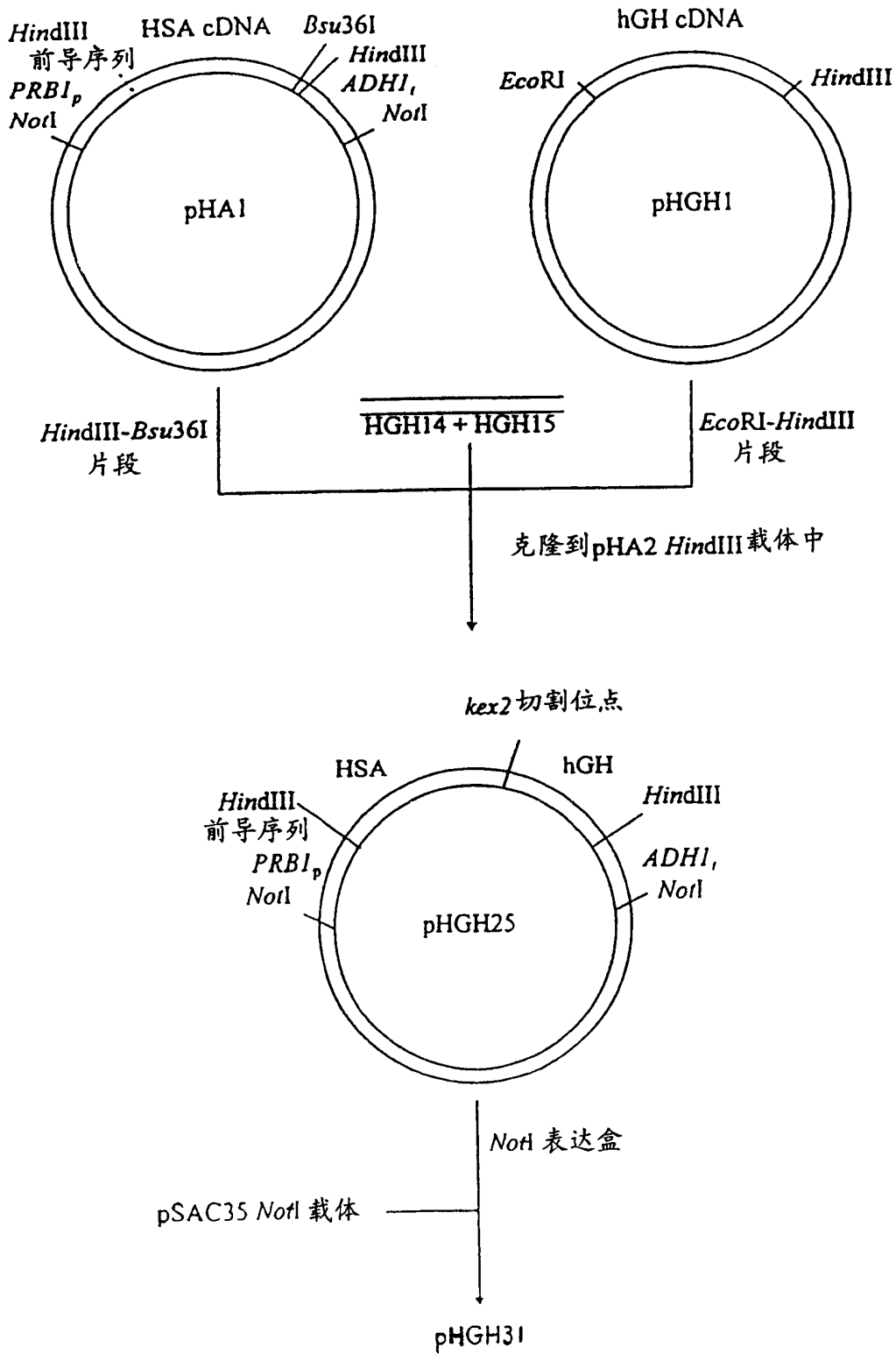


图 9

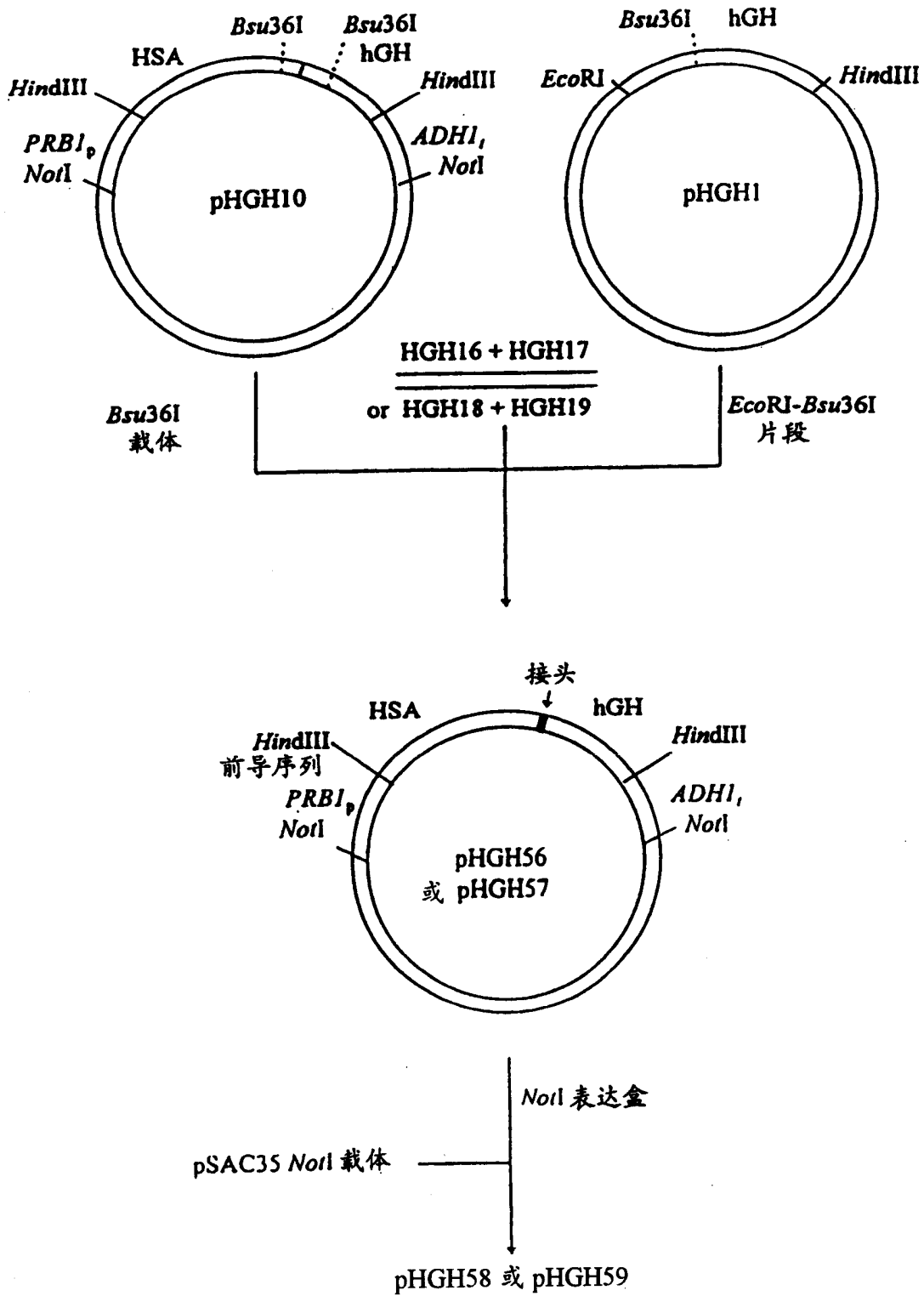
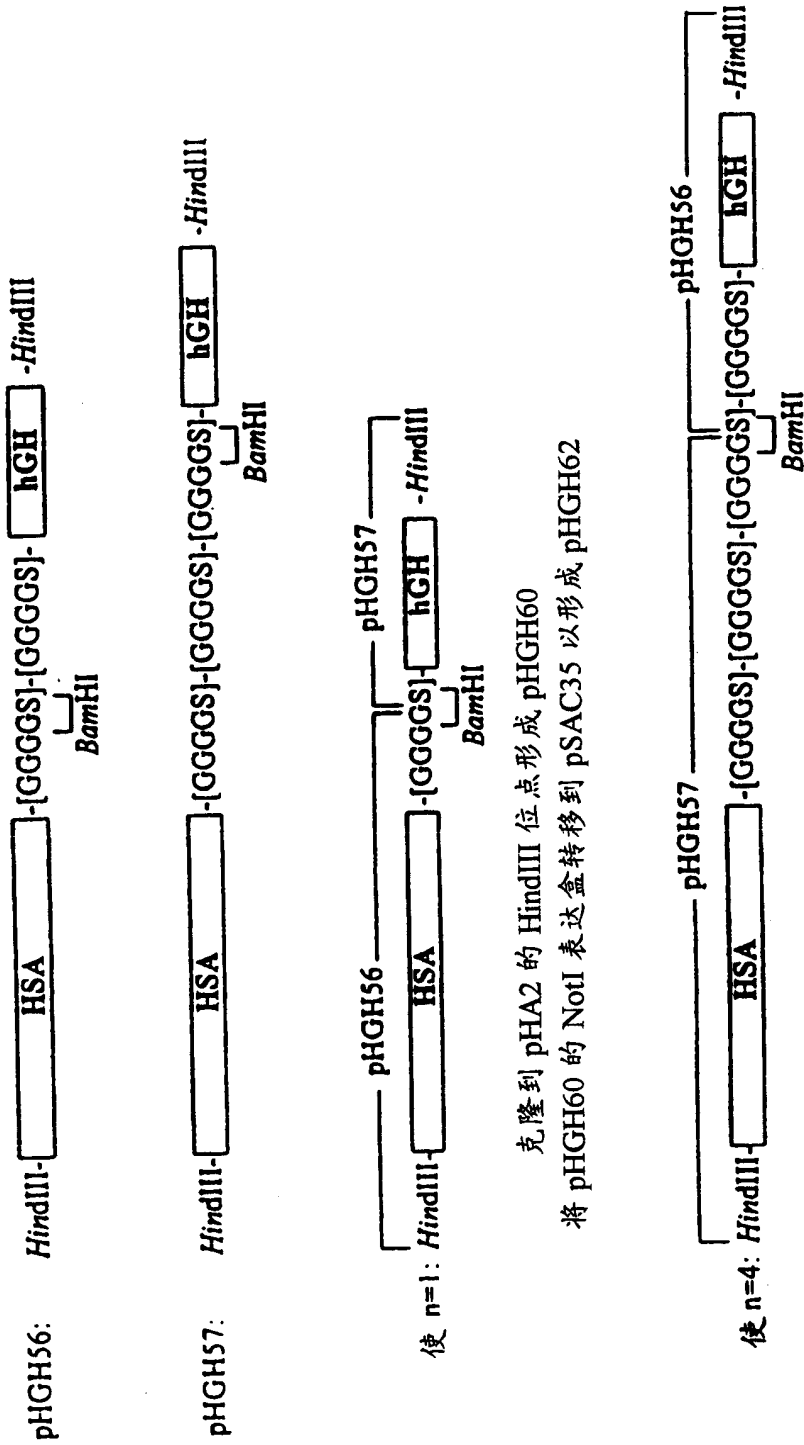


图 10





克隆到 pHA2 的 HindIII 位点形成 pHGH60  
 将 pHGH60 的 NotI 表达盒转移到 pSAC35 以形成 pHGH62

克隆到 pHA2 的 HindIII 位点以形成 pHGH61

将 pHGH61 的 NotI 表达盒转移到 pSAC35 中形成 pHGH63

图 11

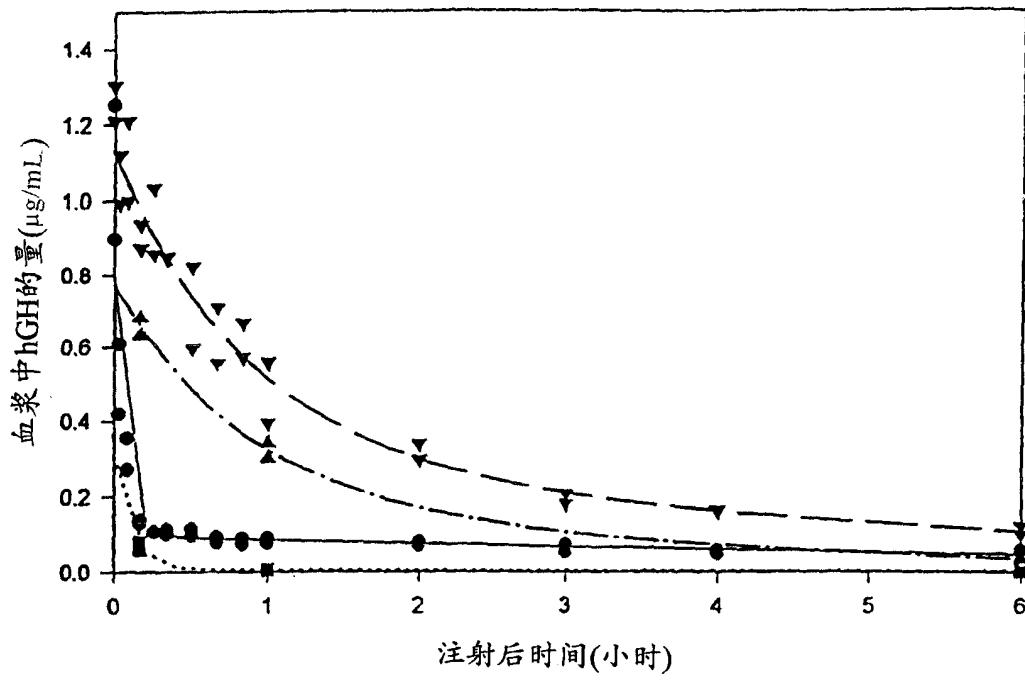


图 12